成都地区四种食尸性蝇类 mtDNA 中 COⅠ基因序列检测

蔡继峰[1]，刘　敏[1]，应斌武[1]，董建国[2]，邓振华[1]，陶　涛[1]，
潘洪富[1]，张红霞[1]，闫红涛[1]，廖志钢[1*]
（1. 四川大学华西基础与法医学院，成都　610041；2. 上海第二医科大学基础医学院病理教研室，上海　200025）

摘要：通过检测食尸性苍蝇线粒体 DNA(mtDNA)上细胞色素氧化酶亚基Ⅰ(COⅠ)中 278 bp 基因序列，鉴定食尸性苍蝇的种类，解决依据形态学方法不能鉴定苍蝇卵的种类、很难鉴定幼虫种类的难题，作为法医鉴别食尸性苍蝇及其幼虫、卵种类依据。随机采集放置在成都地区室外草地兔尸体上的 4 种 15 个食尸性苍蝇。利用改进的小型昆虫 DNA 匀浆方法提取上述苍蝇 mtDNA；通过 Perkin-Elmer 9600 扩增仪进行 PCR 扩增；聚丙烯酰胺非变性凝胶连续缓冲体系垂直电泳和银染显色技术进行扩增结果检测；PCR 胶回收试剂盒纯化；ABI 377 测序仪测序；MEGA2.1 软件包进行序列分析和构建系统发育树。在双翅目食尸性苍蝇的种内进化分歧均数小于 1%，种间进化分歧均数大于 7%。mtDNA 上 COⅠ序列分析能有效地对主要的食尸性苍蝇进行种类鉴定。该检测方法快速、简便和精确，能作为法医鉴别食尸性苍蝇种类的可靠依据。

关键词：食尸性苍蝇；种类鉴定；线粒体 DNA；细胞色素氧化酶亚基Ⅰ
中图分类号：DF795.1　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2005)01-0101-06

Sequencing of mitochondrial DNA cytochrome oxidase subunit Ⅰ for identification of sarcosaphagous flies (Diptera) in Chengdu

CAI Ji-Feng[1], LIU Min[1], YING Bin-Wu[1], DONG Jian-Guo[2], DENG Zheng-Hua[1], TAO Tao[1], PAN Hong-Fu[1], ZHANG Hong-Xia[1], YAN Hong-Tao[1], LIAO Zhi-Gang[1*] (1. West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Pathology, School of Preclinical Medicine, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China)

Abstract: To solve the problems of identification of sarcosaphagous flies and their larvae and eggs, for which all of eggs and most of larvae could not be identified using their morphological features only, the feasibility of species identification based on a 278 bp region of the gene for cytochrome oxidase subunit Ⅰ (COⅠ) encoding region of mtDNA was evaluated. Samples were collected on the corpses of rabbits on the grassland in the Chengdu district. The mtDNA of flies was extracted using the improved technique in grinding tissue during extracting DNA from small insects. Reactions were conducted on a Perkin-Elmer 9600 thermal cycler, followed by vertical non-denaturing polyacrylamide electrophoresis. PCR products were purified using the Nucleic Acid Purification Kit. Sequences of both strands were obtained by direct sequence of the double-stranded PCR product using one of the PCR primers and the ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit. Sequence reactions were electrophoresed on ABI Model 377 DNA Sequencers. A neighbour-joining tree using the Tamura and Nei model of nucleotide substitution was constructed using the MEGA2.1 package. The analysis of a 278 base pairs region of the gene for COⅠ encoding region of mtDNA of sarcosaphagous flies collected from Chengdu district showed less than 1% sequence divergence within species and about 10% divergence between species. So it is concluded that this region of the gene for COⅠ encoding region of mtDNA of sarcosaphagous flies can be effectively used for identification of them to species level. Owing to the speed, easiness and accuracy of current nucleotide sequencing technology, it is likely to enable the reliable identification of sarcosaphagous flies.

Key words: Sarcosaphagous flies; species identification; mtDNA; COⅠ

在法医昆虫学领域，食尸性苍蝇在尸体上的演替规律，已被广泛地应用于死亡时间和死亡现场的

作者简介：蔡继峰，男，1967 年 2 月生，在读法医病理学博士，E-mail：cjf-jifeng@163.com
＊通讯作者 Author for correspondence，E-mail：wangyh11@163.com
收稿日期 Received：2004-05-12；接受日期 Accepted：2004-12-21

推断(Catts and Haskell,1990)。传统上,仅依据苍蝇形态学特征来判断种类。由于苍蝇具有形态结构复杂和种间形态差异微小等特点,种类鉴别较难,尤其是苍蝇卵、幼虫及蛹的种类很难鉴别(刘敏等,1999)。而利用线粒体 DNA(mtDNA)上细胞色素氧化酶亚基Ⅰ(COⅠ)的基因序列对食尸性苍蝇进行种类鉴定,是近几年来发展起来的新技术(Caterino *et al*.,2000),该检测方法能有效地将食尸性蝇类鉴定到属种的水平,但目前国内尚未见这方面的报道。本研究主要是运用该技术对成都地区常见的 3 科 4 属 4 种双翅目食尸性苍蝇 mtDNA 上 COⅠ中 278 bp 的基因序列进行鉴别。由于该方法的快速、简便和精确,它将成为法医鉴别食尸性苍蝇种类的可靠依据,有助于法医对死亡时间和死亡现场的正确分析,进而对死因不明的案件进行定性。

1 材料与方法

1.1 样本

样本采集于成都市公安局室外草地上,共 15 头成虫干标本(保存 28 个月),由四川大学寄生虫教研室进行形态学分类鉴定。

1.2 引物

COⅠ引物为 Sperling 等(1993)和 Wells 等(1999)用过的 C1-J-2495(sense)和 C1-N-2800(antisense):

C1-J-2495: 5′-CAG CTA CTT TAT GAG CTT TAG G-3′;

C1-N-2800: 5′-CAT TTC AAG CTG TGT AAG CAT C-3′。

1.3 mtDNA 的提取

利用安瑞生等(2002)改进的小型昆虫 DNA 匀浆方法提取上述食尸性苍蝇 mtDNA。具体提取方法:配制提取液 A:1%的 SDS,50 mmol/L Tris-HCl,25 mmol/L NaCl,25mmol/L EDTA;提取液 B: 3 mmol/L KAC(pH 7.8)。将上述样本用双蒸水漂洗,吸水纸吸干后,分别用消毒剪刀剪去苍蝇头、腹、足及翅膀。将留取的苍蝇胸部肌肉分别置于 1.5 mL 离心管中,加入 20 μL 提取液 A,放置于 -20℃冰箱中,4 min 后取出,用牙签捣碎,匀浆,牙签用 100 μL 提取液 A 冲洗;65℃水浴 45 min(中间取出混匀 2 次);加入等体积的提取液 B(可见沉淀),冰上放置 1 h 以上;12 000 r/min离心 10 min,移上清液于另一离心管中;加入等体积的饱和酚,轻混匀,12 000 r/min 离心 10min;移上清液于另一离心管中 12 000 r/min 离心 10 min,加入 2 倍体积预冷的无水乙醇,混匀,-20℃放置 1 h 以上;12 000 r/min 离心 15 min,小心倾尽上清液,收集沉淀,用 70% 乙醇洗涤 1 次;晾干沉淀;37℃干燥 15 min,每管加入 50 μL 1×TE,充分溶解后 -20℃保存备用。

1.4 PCR 扩增及电泳

PCR 总体积为 37.5 μL。22.1 μL DDH_2O,DNA 模板 2.5 μL(20~40 ng),6 μL dNTP(1 mmol/L),1.5 U TaqDNA 聚合酶(华美公司),3.75 μL 10×buffer(Mg^{2+} 1.5 mmol/L),2.25 μL Mg^{2+}(25 nmol/L),0.3 μL 每条引物(50 nmol/mL)。通过 Perkin-Elmer 9600 扩增仪进行 PCR 扩增。反应条件为:38 次 PCR 循环(92℃ 变性 1 min,48℃退火 1 min,72℃延伸 2 min,最后 PCR 产物保存在 4℃条件下)。PCR 产物用聚丙烯酰胺(T=7%,C=5%)非变性凝胶连续缓冲体系垂直电泳和银染显色技术进行检测(Allen *et al*.,1990)。

1.5 PCR 扩增产物纯化和测序

扩增产物用回收试剂盒纯化(上海申能博彩公司),使用 ABI377(PE 公司,美国)自动测序仪进行测序。

1.6 PCR 扩增产物纯化后的测序结果分析

用 MEGA2.1 软件包(Kumar *et al*.,2001)进行结果分析,对上述所得不同地区各种苍蝇的数据做进化距离分析,并构建不同地区各种内和种间的系统发育树,探讨地区差异性及各种内和种间的遗传关系。

2 结果

2.1 形态学分类鉴定结果

15 头苍蝇样本经形态学分类鉴定分为 3 科 4 属 4 种(表 1)。

表 1 成都地区 15 个常见食尸性苍蝇形态学分类鉴定结果

Table 1 Identification of fifteen sarcosaphagous flies from Chengdu district by morphological methods

科 Family	属 Genus	种 Species	样本编号 Specimen no.
丽蝇科 Calliphoridae	金蝇属 *Chrysomya*	大头金蝇 *Ch. megacephala*	A1-A5,O5
	绿蝇属 *Lucilia*	丝光绿蝇 *L. sericata*	N1,N5
蝇科 Muscidae	家蝇属 *Musca*	舍蝇 *M. domestica vicina*	Q1-Q5
麻蝇科 Sarcophagidae	别麻蝇属 *Boettcherisca*	棕尾别麻蝇 *B. peregrina*	R1,R5

2.2 PCR 扩增产物电泳检测结果（见图 1）

该图反映出本实验中的 15 个检材均扩增出产物，且具有相同分子量 278 bp 的片段。

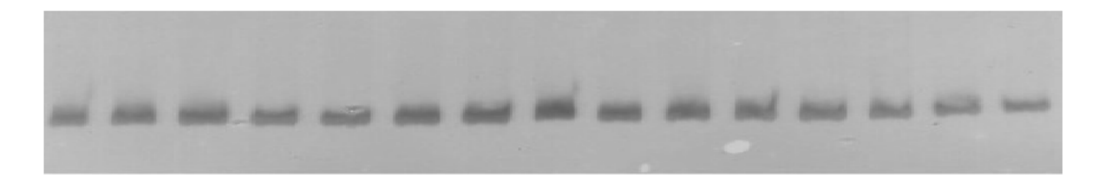


图 1　成都地区 15 个常见食尸性苍蝇 mtDNA 上 COI 中 278 bp 基因 PCR 扩增产物电泳检测结果
Fig.1　The results of electrophoresis of a 278 bp region of the gene for COⅠ encoding region of mtDNA of sarcosaphagous flies from Chengdu district

2.3 基因序列比对分析

将所测得的上述成都地区 3 科 4 属 4 种 15 个常见食尸性苍蝇 mtDNA COI 中 278 bp 基因序列在 GenBank 中作 BLAST 搜索，利用核酸序列分析软件 DNAMAN，version 4.0（Lynnon BioSoft，Copyright 1994 – 98）对序列进行排序剪裁，并将完整的序列提交 GenBank 注册（表 2）。

表 2　成都地区 15 个常见食尸性苍蝇 mtDNA COI 中 278 bp 基因序列在 GenBank 中的登录号
Table 2　GenBank accession numbers of a 278 bp region of the gene for COⅠ encoding region of mtDNA of sarcosaphagous flies from Chengdu district

种 Species	样本编号 Specimen no.	收集地点 Collection locality	登录号 GenBank accession number
大头金蝇 *Ch. megacephala*	A1 – A5，O5	成都 SA（30°05'S，102°54'E）	AY818115 – AY818120，AY818094
丝光绿蝇 *L. sericata*	N1，N5	成都 SA（30°05'S，102°54'E）	AY818095，AY818096
舍蝇 *M. domestica vicina*	Q1，Q5	成都 SA（30°05'S，102°54'E）	AY818108，AY818109
棕尾别麻蝇 *B. peregrina*	R1，R5	成都 SA（30°05'S，102°54'E）	AY818121，AY818122

图 2 是运用 MEGA2.1 软件包对检测结果进行比对后的基因差异情况（包括差异碱基，及其相应位置）。

2.4 UPGMA 无根系统发育树

图 3 是运用 MEGA2.1 软件包中 Kimura's two-parameter 模式对上述成都地区 3 科 4 属 4 种 15 个常见食尸性苍蝇 mtDNA 上 COI 中 278 bp 基因序列进行分析后，用距离法所建立的 UPGMA 无根系统发育树。

该树反映对成都地区上述 3 科 4 属 4 种 15 个食尸性苍蝇 mtDNA 上 COI 中 278 bp 基因序列检测结果进行分析后的遗传进化关系。结果表明（如图 2 所示）：自上而下 3 个大的簇分别代表丽蝇科、家蝇科、麻蝇科。在种内水平，6 种大头金蝇、2 种舍蝇、5 种棕尾别麻蝇的种内 Bootstrap 检验的可信度各为 100%，2 种丝光绿蝇的种内的可信度分别为 98%；在种间水平，大头金蝇与丝光绿蝇的可信度为 97%。

2.5 种内及种间进化分歧

表 3 是运用 MEGA2.1 软件包中的 Kimura's two-parameter 模式对成都地区上述 3 科 4 属 4 种 15 个常见食尸性苍蝇 mtDNA 中 COI 278 bp 基因序列进行分析后所建立的种内及种间进化分歧表。

该表反映对成都地区上述 3 科 4 属 4 种 15 个食尸性苍蝇 mtDNA 上 COI 中 278 bp 基因序列检测结果进行分析后所建立的种内及种间进化分歧，进而反映进化遗传关系。结果表明，上述苍蝇 mtDNA 上 COⅠ基因序列的种内进化分歧均数：大头金蝇、舍蝇、棕尾别麻蝇均为 0，而丝光绿蝇为 0.99%，均小于 1%；种间进化分歧均数：大头金蝇与丝光绿蝇之间为 7.2%，大头金蝇与舍蝇之间为 15.2%，大头金蝇与棕尾别麻蝇之间为 11.7%；丝光绿蝇与棕尾别麻蝇之间为 16.0%，丝光绿蝇与舍蝇之间为 11.3%；舍蝇与棕尾别麻蝇之间为 17.8%；均大于 7%。

```
A1. AGC TAA TTC ATC AAT TGA CAT TAT TTT ACA TGA TAC ATA TTA TGT AGT AGC TCA CTT CCA TTA TGT TCT ATC AAT GGG
A2. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
A3. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
A4. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
A5. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
O5. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
N1. ... ... C.. T.. .G. ... T.. ... ... ... ... ... ... C.. ... ... ... ... ... ... ... ... .T. ... ... ...
N5. ... ... C.. T.. .G. ... T.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .T. ... ... A..
Q1. ... ... ... ... TG. ... T.. ... ... ... ... ... T.. ... ... T.. ... A.. T.. T.. ... ... .T. ... ... A..
Q2. ... ... ... ... TG. ... T.. ... ... ... ... ... T.. ... ... T.. ... A.. T.. T.. ... ... .T. ... ... A..
Q3. ... ... ... ... TG. ... T.. ... ... ... ... ... T.. ... ... T.. ... A.. T.. T.. ... ... .T. ... ... A..
Q4. ... ... ... ... TG. ... T.. ... ... ... ... ... T.. ... ... T.. ... A.. T.. T.. ... ... .T. ... ... A..
Q5. ... ... ... ... TG. ... T.. ... ... ... ... ... T.. ... ... T.. ... A.. T.. T.. ... ... .T. ... ... A..
R1. ... ... ... ... ... ... T.. ... .C. T.. ... ... ... C.. ... ... ... ... ... ... C.. ... A.. T.. ... A..
R5. ... ... ... ... ... ... T.. ... .C. T.. ... ... ... C.. ... ... ... ... ... ... C.. ... A.. T.. ... A..

A1. AGC TGT ATT TGC TAT TAT AGC AGG ATT TGT TCA TTG ATT CCC TCT ATT TAC TGG ATT AAC TTT AAA TAG CAA GTT ATT
A2. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
A3. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
A4. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
A5. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
O5. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
N1. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... C.. ..A T.. .T. ... ... A.. ... ... ... ... ..C T.. .A. ...
N5. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..A T.. ... ... ... A.. ... ... ... ... ..C ... .A. ...
Q1. ... A.. ... ... A.. ... ... T.. ... .A. C.. ... ..A ... A.. T.. ... ... ... G.. ... ... ..A T.. A.G ...
Q2. ... A.. ... ... A.. ... ... T.. ... .A. C.. ... ..A ... A.. T.. ... ... ... G.. ... ... ..A T.. A.G ...
Q3. ... A.. ... ... A.. ... ... T.. ... .A. C.. ... ..A ... A.. T.. ... ... ... G.. ... ... ..A T.. A.G ...
Q4. ... A.. ... ... A.. ... ... T.. ... .A. C.. ... ..A ... A.. T.. ... ... ... G.. ... ... ..A T.. A.G ...
Q5. ... A.. ... ... A.. ... ... T.. ... .A. C.. ... ..A ... A.. T.. ... ... ... G.. ... ... ..A T.. A.G ...
R1. ... A.. ... ... ... ... ... ... T.. ... ... ... ..A ... .T. ... ... ... ... ... A.. ... .GC T.. AA. ...
R5. ... A.. ... ... ... ... ... ... T.. ... ... ... ..A ... .T. ... ... ... ... ... A.. ... .GC T.. AA. ...

A1. AAA GAG TCA ATT TGC TAT TAT ATT TAT CGG AGT AAA TTT AAC ATT CTT CCC TCA ACA TTT CTT AGG ATT AGC AGG TAT
A2. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
A3. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
A4. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
A5. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
O5. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
N1. ... A.. ... ... ... ... ... ... ... T.. G.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... A..
N5. ... ... ... ... ... ... ... ... ... T.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .C. ... ... A..
Q1. ... A.. ... ... .T. A.. ... ... ... T.. G.. T.. ... ... T.. T.. T.. C.. ... ... T.. ... ... ... T.. ...
Q2. ... A.. ... ... .T. A.. ... ... ... T.. G.. T.. ... ... T.. T.. T.. C.. ... ... T.. ... ... ... T.. ...
Q3. ... A.. ... ... .T. A.. ... ... ... T.. G.. T.. ... ... T.. T.. T.. C.. ... ... T.. ... ... ... T.. ...
Q4. ... A.. ... ... .T. A.. ... ... ... T.. G.. T.. ... ... T.. T.. T.. C.. ... ... T.. ... ... ... T.. ...
Q5. ... A.. ... ... .T. A.. ... ... ... T.. G.. T.. ... ... T.. T.. T.. C.. ... ... T.. ... ... ... T.. ...
R1. ... A.. ... ... .A. ... ... ... ... A.. ... ... ... ... T.. ... ... ... ... ... .C. ... .C. T.. G.. C..
R5. ... A.. ... ... .A. ... ... ... ... A.. ... ... ... ... T.. ... ... ... ... ... .C. ... .C. T.. G.. C..

A1. ACC TCG ACG ATA CTC AGA CTA TCC AGA TGC TTA CAC AGc ttg aa
A2. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..
A3. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..
A4. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..
A5. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..
O5. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..
N1. ... A.. ... ... T.. ... ... C.. ... ... ... ... ... ... ..
N5. ... A.. ... ... T.. ... ... C.. ... ... ... ... ... ... ..
Q1. ... ... C.. ... T.. ... T.. ... ... ... ... ... ... ... ..
Q2. ... ... C.. ... T.. ... T.. ... ... ... ... ... ... ... ..
Q3. ... ... C.. ... T.. ... T.. ... ... ... ... ... ... ... ..
Q4. ... ... C.. ... T.. ... T.. ... ... ... ... ... ... ... ..
Q5. ... ... C.. ... T.. ... T.. ... ... ... ... ... ... ... ..
R1. ... ... ... ... T.. ... T.. C.. ... ... ... ... ... ... ..
R5. ... ... ... ... T.. ... T.. C.. ... ... ... ... ... ... ..
```

图 2 成都地区 15 个常见食尸性苍蝇 mtDNA 上 COI 中 278 bp 基因序列比对结果

Fig. 2 The result of different base pairs of a 278 bp region of the gene for CO Ⅰ encoding region of mtDNA of sarcosaphagous flies from Chengdu district.

A.G.C.T.:表示以一种大头金蝇(A1)为标准的差异碱基 Representing different base pairs based on the sequences of a species of *Ch. megacephala*(A1).
A1 – A5, O5:大头金蝇 *Ch. megacephala*; N1, N5: 丝光绿蝇 *L. sericata*; Q1 – Q5:舍蝇 *M. domestica vicina*; R1, R5: 棕尾别麻蝇 *B. peregrina*;表 3 同 The same for Table 3.

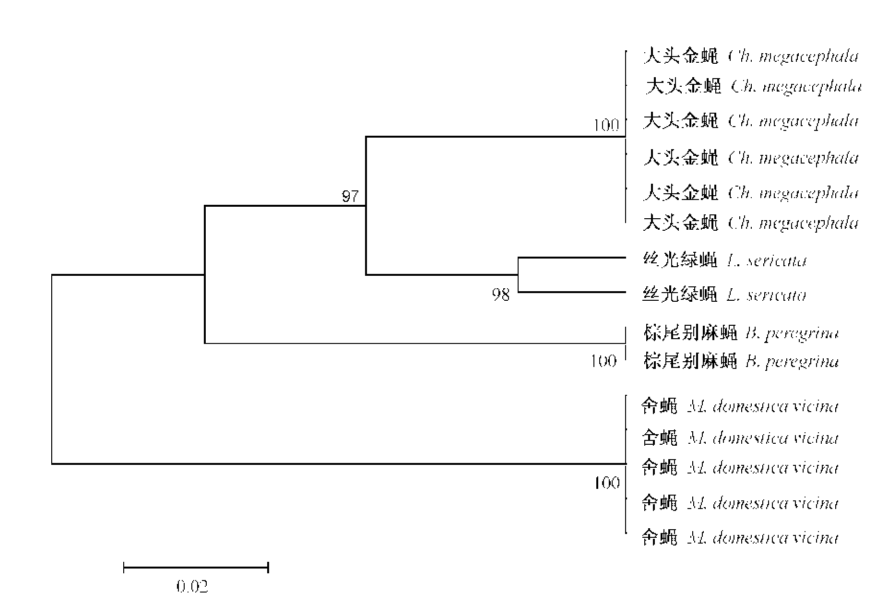


图 3 采用 MEGA 的 UPGMA 算法推定的成都地区常见食尸性苍蝇分子系统进化树(进化距离采用 Kimura's two-parameter 模式)
Fig. 3 UPGMA tree of sarcosaphagous flies from Chengdu district obtained by Kimura's two-parameter model of MEGA

表 3 成都地区常见食尸性苍蝇 mtDNA 中 COⅠ 278 bp 基因序列种内及种间进化分歧(Kimura's two-parameter 模式)
Table 3 Evolutionary divergence of inner-species and inter-species of fifteen sarcosaphagous flies collected from Chengdu district based on a 278 bp region of the gene for COⅠ encoding region of mtDNA (Kimura's two-parameter mode)

标本编号 Specimen no.	A1	A2	A3	A4	A5	05	N1	N5	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	R1	R5
A1	–														
A2	0.00	–													
A3	0.00	0.00	–												
A4	0.00	0.00	0.00	–											
A5	0.00	0.00	0.00	0.00	–										
05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	–									
N1	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	–								
N5	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.029	–							
Q1	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.16	0.16	–						
Q2	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.16	0.16	0.00	–					
Q3	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.16	0.16	0.00	0.00	–				
Q4	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.16	0.16	0.00	0.00	0.00	–			
Q5	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.16	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	–		
R1	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.11	0.11	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	–	
R5	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.11	0.11	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.00	–

3 讨论

本实验运用 mtDNA 中 COⅠ278 bp 的基因序列检测方法所鉴定的上述食尸性苍蝇种类与形态学分类鉴定方法所鉴定的种类的对比结果一致，说明运用形态学分类鉴定方法对食尸性苍蝇进行种类鉴定的技术已经比较成熟，但是，后者需要具有较高的专业技术人员(Catts and Goff, 1992)。相反，随着分子生物学技术的不断发展，基因序列检测方法越来越普及、简单、实用。

在系统发育及亲缘关系确定方面，本实验是通

过 MEGA 软件运用统计学上的距离法构建系统发育树，推断其亲关系及遗传距离，进一步据此判断食尸性苍蝇种类。该 UPGMA 无根系统发育树结果反映出：在上述苍蝇中，在种级水平，6 种大头金蝇、2 种舍蝇、5 种棕尾别麻蝇种内具有高度的同源性（homology），种间同源性相差明显，这样能够确信在食尸性苍蝇种内序列差异和种间序列差异均数百分比范围内无重叠，该结论支持运用该方法可有效地对食尸性苍蝇鉴定到属种水平的论点（Wells *et al*.，1999）。

在上述种内及种间进化分歧比较方面，所检测苍蝇 mtDNA 上 COⅠ基因序列的种内进化分歧均数，大头金蝇、舍蝇、棕尾别麻蝇均小于 1%。种间进化分歧均数，大头金蝇与丝光绿蝇之间，大头金蝇与舍蝇之间，大头金蝇与棕尾别麻蝇之间；丝光绿蝇与舍蝇之间，丝光绿蝇与棕尾别麻蝇之间；舍蝇与棕尾别麻蝇之间，均大于 7%。而 Wells 等报道在双翅目食尸性苍蝇的种内进化分歧均数小于 1%，种间进化分歧大于 3%，便能够确信在食尸性苍蝇种内序列差异和种间进化分歧均数百分比范围内无重叠，并由此根据 COⅠ序列进化分歧判断两个个体是否同种（Wells *et al*.，1999）。因此，本实验结果优于 Wells 等人的结果，能够确信在食尸性苍蝇种内序列进化分歧和种间序列进化分歧均数百分比范围内无重叠，并由此根据 COⅠ序列进化分歧判断两个个体是否同种。

总之，mtDNA 上 COⅠ序列分析技术是目前分析进化及系统发育研究中最有效、最可靠的方法（Caterino *et al*.，2000），在法医昆虫分子鉴定的研究中也最常见。通过对食尸性苍蝇 mtDNA 上 COⅠ中 278bp 的基因序列进行鉴定，构建系统发育树，做进化距离分析，探讨同一和不同地区食尸性苍蝇种内和种间的进化分歧及遗传关系，有望解决食尸性苍蝇种类鉴定的难题，进而为法医学准确推断死亡时间提供依据；同时，探讨不同地区食尸性苍蝇种内和种间的进化分歧及遗传关系，有望解决不同地区食尸性苍蝇种内和种间进化分歧的地区差异性，可以帮助判断尸体是否被转移过，进而准确地推断死亡现场。

由于该方法的快速、简便和精确，在我国它将成为法医鉴别食尸性苍蝇种类的可靠依据，有助于法医对死亡时间和死亡现场的正确分析，进而对死因不明的案件进行准确的定性。但该技术应用于食尸性苍蝇分类研究时间还比较短，从实验研究技术直至结果分析，都还很不完善。但我们有理由相信，经过国内外法医工作者的不懈努力，在不久的将来，通过多对引物的设计，敏感、有效片段的探索，该技术能进一步提高鉴别力、降低成本、节省时间，它必将成为法医鉴别食尸性苍蝇种类的可靠依据。

参 考 文 献（References）

Allen CR，Graves G，Budowle B，1990. Polymerase chain reaction amplification products separated on rehydratable polyacrylamid gels and stained with silver. *Biotechniques*，7：736－744.

An RS，Tan SJ，Chen XF，2002. Improvement in grinding tissue during extracting DNA from small insects. *Entomological Knowledge*，39(4)：311－312.［安瑞生，谭声江，陈晓峰，2002. 小型昆虫 DNA 提取时匀浆方法的改进. 昆虫知识，39(4)：311－312］

Caterino MS，Cho S，Sperling SAH，2000. The current state of insect molecular systematics：a thriving tower of babel. *Ann. Rev. Entomol*.，45：1.

Catts EP，Goff ML，1992. Forensic entomology in criminal investigations. *Ann. Rev. Entomol*.，37：253－272.

Catts EP，Haskell NH，1990. Entomology and Death. A Procedural Guide. Clemson：Joyce's Print Shop. 180.

Kumar S，Tamura K，Jakobsen IB，Nei M，2001. MEGA2：Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software. Arizona State University，Tempe，Arizona，USA.

Liu M，Deng ZH，Sun DH，1999. Forensic Entomology. *Advances and Practices in Forensic Medicine*，2：193－198.［刘敏，邓振华，孙大宏，1999. 法医昆虫学. 法医学实践与进展，2：193－198］

Landry BS，Dextraze L，Boivin G，1993. Random amplified polymorphic DNA fingerprinting and genetic variability assessment of minute parasitic wasp species（Hymenoptera：Mymaridae and Trichogrammatidae）used in biological control program of phytophagous insects. *Genome*，36：580－587.

Sperling FAH，Anderson GS，Hickey DA，1993. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *Forensic Sci. Int*.，39：418－427.

Wells JD，Sperling FAH，1999. Molecular phylogeny of *Chrysomya albiceps* and *C. rufifacies*. *J. Med. Entomol*.，36：222－226.

（责任编辑：袁德成）